(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 7 月 6 日 (06.07.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/124266 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 30/02 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 30/08 (2006.01) *B01J 20/283* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/119544

(22) 国际申请日: 2022 年 9 月 19 日 (19.09.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202111615594.3 2021年12月27日 (27.12.2021) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。

(72) 发明人: 张毅(ZHANG, Yi); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。

魏皓东(WEI, Haodong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。 冯永巍(FENG, Yongwei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。 何永熙(HE, Yongxi); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。 鲁晨辉(LU, Chenhui); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。 徐力志(XU, Lizhi); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。 王文龙(WANG, Wenlong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。 沈晓芳(SHEN, Xiaofang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。 严秀平(YAN, Xiuping); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING CASEIN GLYCOMACROPEPTIDE HAVING SIALIC ACID GLYCOSYL

(54) **发明名称:** 一种检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法

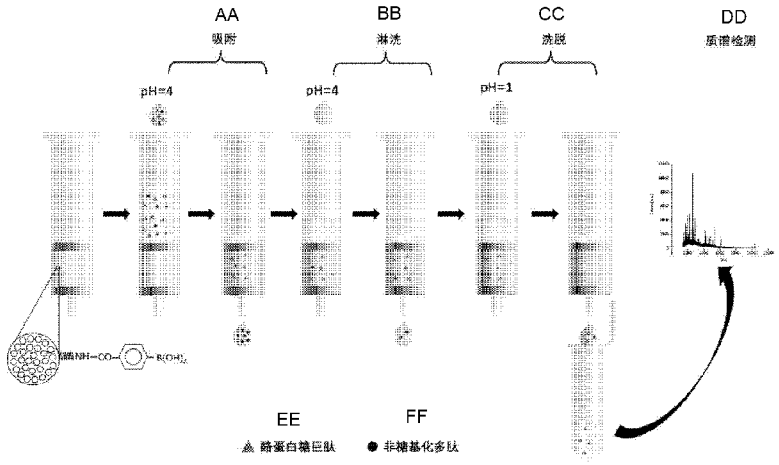


图 1

AA Adsorption
BB Rinsing
CC Elution
DD Detection by mass spectrometry
EE Casein glycomacropeptide
FF Non-glycosylated polypeptide

(57) **Abstract:** A method for detecting casein glycomacropeptide having sialic acid glycosyl by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and enrichment with a boronate affinity column packed with a phenyl boronic acid-modified mesoporous silica, which belongs to the field of food product analysis and detection. The detection method comprises the following steps: (1) preparation of a sample; (2) enrichment and purification with a boronate affinity column; and (3) detection by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. By using the affinity of phenyl boronic acid to specific glycosyl, i.e. sialic acid, on serine and threonine residues in casein glycomacropeptide, regulating the adsorption and elution of casein glycomacropeptide having sialic acid glycosyl by means of changing the pH, and combining with the high sensitivity and accuracy of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, casein

WO 2023/124266 A1

[见续页]

(74) 代理人：无锡承果知识产权代理有限公司 (CHENGGUO INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD)；中国江苏省无锡市滨湖区科教软件园23号4楼杜钰, Jiangsu 214000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明：
— 关于发明人身份(细则4.17(i))
— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布：
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

glycomacropeptide having sialic acid glycosyl in a complex matrix of a formula food product for special medical use for phenylketonuria can be qualitatively and quantitatively analyzed.

(57) 摘要：一种以苯硼酸修饰介孔二氧化硅为填料的硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，属于食品分析检测领域。检测方法包括以下步骤：(1)样品制备；(2)硼亲和柱富集净化；(3)液相色谱-串联质谱检测。利用苯硼酸对酪蛋白糖巨肽中丝氨酸和苏氨酸残基上特殊糖基-唾液酸的亲和特性，通过改变pH调控带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的吸附和洗脱，结合液相色谱串联质谱的高灵敏度和精确度，能对苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品复杂基质中的带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽进行定性和定量分析。

一种检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法

技术领域

本发明涉及食品分析检测技术领域，具体涉及一种苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的检测方法，特别涉及一种硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的方法。

背景技术

苯丙酮尿症，简称 PKU，患者由于体内苯丙氨酸羟化酶缺失或活性低下不能代谢通过饮食摄入的苯丙氨酸，因此需要终身服用低苯丙氨酸的整蛋白替代性特殊医学用途配方食品满足日常营养所需。酪蛋白糖巨肽（Casein glycomacropeptide，CGMP）是 κ -酪蛋白经凝乳酶酶解生成的氨基酸序列 106-169 位的多肽，不含苯丙氨酸。此外，酪蛋白糖巨肽含有唾液酸、半乳糖、乙酰氨基半乳糖和磷酸等多种基团，其中唾液酸具有促进婴幼儿大脑发育、抗菌消炎等功效，对于 PKU 患者，尤其是婴幼儿 PKU 患者是理想的特殊医学用途配方食品。由于酪蛋白糖巨肽结构特殊、制备复杂、成本较高，为确定 PKU 特殊医学用途配方食品中多肽成分的真正组成和其中带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的准确含量，有必要对 PKU 特殊医学用途配方食品中带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽进行定性、定量分析。

液相色谱串联质谱法分析多肽灵敏度高、准确度好，但是复杂的多肽样品直接检测时，共存多肽和蛋白会降低酪蛋白糖巨肽的离子化效率，从而降低其响应值。酪蛋白糖巨肽上具有多个糖基化位点，是典型的糖肽，而硼亲和柱上的苯硼酸基团对糖基上的顺式邻二醇结构具有特殊亲和作用，可以实现糖肽的富集净化。

中国发明专利“一种苯硼酸材料富集糖肽的方法”（CN201310357237.0）利用硼亲和柱富集糖肽。该方法所用的硼亲和柱填料是苯硼酸修饰硅球，其粒径为 2-50 米；适用的蛋白来源为组织、细胞、血清或尿液等生物样品中蛋白或者是转铁蛋白、胎球蛋白、辣根过氧化物酶、核糖核酸酶 B；蛋白酶解用酶为胰蛋白酶、内肽酶、胃蛋白酶、糜蛋白酶；冲洗溶剂必须有乙腈或甲醇等有机溶剂，pH 为中性；洗脱溶剂必须有乙腈或甲醇等有机溶剂。该方法以上几个关键分析条件并不适用于 PKU 特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的富集。此外，Qibin

Zhang 等在 Enrichment and Analysis of Nonenzymatically Glycated Peptides: Boronate Affinity Chromatography Coupled with Electron-Transfer Dissociation Mass Spectrometry (Journal of Proteome Research 2007, 6, 2323-2330)一文中采用硼亲和柱富集分离糖蛋白和糖肽。该方法所用的硼亲和柱填料是苯硼酸修饰的琼脂糖凝胶；硼亲和柱层析时采用了自动化的色谱系统以及梯度流动相；硼亲和柱层析后必须以 C18 固相萃取柱脱盐；适用样品为人血清中的糖蛋白和胰蛋白酶消化的糖肽；最后用交替电子转移离解(ETD)和碰撞诱导离解(CID)串联质谱分析糖肽；应用于糖尿病诊疗。该方法以上几个关键分析条件也不适用于 PKU 特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的富集和分析。

生物样品与食品样品在组成上有很大区别，例如食品中会添加油脂、维生素、稳定剂等成分，这些添加物的存在使食品样品的前处理过程和分析过程完全不同于生物样品。目前，尚未有适合于酪蛋白糖巨肽的亲和柱净化富集-液相色谱串联质谱检测方案。

因此，需要设计一种硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，实现对苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的检测。

发明内容

本发明的目的在于提供一种灵敏快速的硼亲和硅柱净化-液相色谱-串联质谱检测苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品中唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法。

为了解决现有技术的问题，本发明提供了如下技术方案：本发明的一种硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，包括如下步骤：以苯硼酸修饰介孔二氧化硅为硼亲和柱填料，利用苯硼酸对酪蛋白糖巨肽中丝氨酸和苏氨酸残基上特殊糖基—唾液酸的亲和特性，通过改变 pH 调控带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的吸附和洗脱，再以液相色谱-串联质谱分析，实现对苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的检测；步骤如下：（1）样品制备；（2）硼亲和柱富集净化；（3）液相色谱-串联质谱分析。

进一步地，在步骤（1）中，样品制备：准确称取已充分均质样品 5-10 g 于烧杯中，加入 20-30 mL 去离子水溶解，磁力搅拌、加热至 90℃溶解，冷却至室温后用盐酸调节 pH 至 4.5-5.0，定容到 50 mL，转移到离心管中，离心，取 20mL 上清液为样品液；

在步骤（2）中，硼亲和柱富集净化：

所述的硼亲和柱的制备方法：Step1 介孔二氧化硅的合成；Step2 介孔二氧化硅的氨基化；Step3 氨基化介孔二氧化硅的苯硼酸修饰；Step4 硼亲和柱制备；

硼亲和柱上样品液，上样结束后，用 pH 为 4.5-5.0 的盐酸水溶液淋洗，抽干柱内残留液，并弃去以上全部流出液，最后用 2 mL pH 值约为 1.0 的盐酸水溶液洗脱，洗脱液冻干，再用 1 mL 液相色谱流动相重新溶解、定容，得到净化液；

在步骤（3）中，液相色谱-串联质谱分析：净化液经滤膜过滤后供液相色谱-串联质谱仪检测，获得酪蛋白糖巨肽的离子流色谱图和质谱图，将离子流色谱图的峰面积带入标准曲线分析计算，并结合质谱图进行结构鉴定，从而获得样品中酪蛋白糖巨肽的含量和结构信息。

进一步地，在步骤（2）中，Step1 介孔二氧化硅的合成： 0.25-0.3 g 十六烷基三甲基溴化铵溶于 240-250 mL 水中，向其中加入 0.8-1.0 mL NaOH（2.0 mol/L），升温至 80℃，剧烈搅拌，将 5-7 mL 正硅酸乙酯滴加入溶液中，混合物继续搅拌反应 2-5 h，产生白色絮状物。离心弃去上清液，保留沉淀，用水和甲醇分别洗涤三次，60℃真空干燥，之后将 0.4-0.5 g 上述沉淀分散于 150-160 mL 含有 1.5-2.0 mL 浓盐酸的甲醇溶液中，回流 5-8 h 之后离心，沉淀 60℃真空干燥，得到介孔二氧化硅。

进一步地，在步骤（2）中，Step2 介孔二氧化硅的氨基化：称取 0.3-0.4 g 介孔二氧化硅，分散于 80-90 mL 无水甲苯中，加入 0.5-2 mL 氨丙基三乙氧基硅烷，氮气保护加热回流 20-24 h，离心，沉淀用甲苯和甲醇分别洗涤三次后真空干燥，得到氨基化的介孔二氧化硅。

进一步地，在步骤（2）中，Step3 氨基化介孔二氧化硅的苯硼酸修饰：称取 0.2-0.3 g 氨基化介孔二氧化硅分散于 20-25 mL 二甲亚砜中，将 0.8-1.0 g 的 4-羧基苯硼酸、0.1-0.2 g N-羟基琥珀酰亚胺、0.05-0.1 g 1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐依次加入 5-10 mL 二甲亚砜中反应，在室温下搅拌 30-60 min 后加入到上述氨基化介孔二氧化硅分散液中，室温下搅拌 10-24 h，离心，沉淀用二甲亚砜、水、甲醇分别洗涤三次，真空干燥，得到苯硼酸修饰的介孔二氧化硅；

进一步地，在步骤（2）中，Step4 硼亲和柱制备：将 20 mg 苯硼酸修饰的介孔二氧化硅装到聚乙烯固相萃取管中，加上筛板，压实，制得硼亲和柱。

进一步地，在步骤（3）中，用于重新溶解多肽的流动相配比为：含 0.1%甲酸的乙腈水溶液所述的水和乙腈的体积比为 90:10。

进一步地，在步骤（3）中，色谱条件为：色谱柱：Agilent AdvanceBio PeptideMapping 柱；柱温：40℃；进样体积：10 μL；流速 0.3 mL/min；流动相 A 为含有 0.1%甲酸的乙腈水溶液，所述的水和乙腈的体积为 90:10；流动相 B 为含有 0.1%甲酸的乙腈溶液，梯度洗脱：0-5 min，98% A；5-55 min，98%-50% A；55-60 min，50%-10% A；60-75 min，10% A。

进一步地，在步骤（3）中，质谱条件为：电喷雾离子源；正离子扫描；喷雾电压：5500 V；温度：450℃；检测方式：数据依赖型扫描。

进一步地，在步骤（3）中，标准曲线的制作方法为：配制浓度为 0.1-50 μg/mL 的酪蛋白糖巨肽标准溶液，以酪蛋白糖巨肽浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作标准曲线。

本发明所述的硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法在苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品检测中的应用。

有益效果：本发明以苯硼酸修饰介孔二氧化硅为硼亲和柱填料其制备过程简单，利用苯硼酸对酪蛋白糖巨肽中丝氨酸和苏氨酸残基上特殊糖基—唾液酸在特定 pH 下的亲和特性实现高选择性吸附和高回收率洗脱，液相色谱-串联质谱分析洗脱液中的酪蛋白糖巨肽，灵敏、高效地实现对苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的检测。解决目前报道的酪蛋白糖巨肽分离选择特异性不强、杂质多和检测粗放的问题，提供一种选择特异性良好的提取分离酪蛋白糖巨肽的方法，并进行精细结构分析的一种方法。同时，为目前国内酪蛋白糖巨肽标准化检测提供新思路。

附图说明

图 1 为本发明的操作流程示意图。

图 2 为实施例 1 所合成的苯硼酸修饰的介孔二氧化硅的透射电子显微镜图。

图 3 为实施例 1 所合成的苯硼酸修饰的介孔二氧化硅的元素分析图。

图 4 为实施例 2 中富集前后的 MALDI-TOF 质谱图。

具体实施方式

以下实施例是对本发明的进一步说明，而不是限制本发明的范围。

实施例 1

本发明的一种硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，包括如下步骤：以苯硼酸修饰介孔二氧化硅为硼亲和柱填料，利用苯硼酸对酪蛋白糖巨肽中丝氨酸和苏氨酸残基上特殊糖基—唾液酸的亲和特性，通过改变 pH 调控带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的吸附和洗脱，再以液相色谱-串联质谱分析，实现对苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的检测；步骤如下：（1）样品制备；（2）硼亲和柱富集净化；（3）液相色谱-串联质谱分析。

（1）样品制备：准确称取已充分均质样品 5 g 于烧杯中，加入 30 mL 去离子水溶解，磁力搅拌、加热至 100℃溶解，冷却至室温后用盐酸调节 pH 至 5.0，定容到 60 mL，转移到离心管中，离心，取 20 mL 上清液为样品液。

（2）硼亲和柱富集净化：硼亲和柱上样品液，上样结束后，用 pH 为 5.0 的盐酸水溶液淋洗，抽干柱内残留液，并弃去以上全部流出液，最后用 1 mL pH 值约为 1.0 的盐酸水溶液洗脱，洗脱液冻干，再用 1 mL 液相色谱流动相（含 0.1%甲酸的乙腈水溶液（水:乙腈 v:v=90:10））重新溶解、定容，得到净化液。

在步骤（2）中，本发明的一种苯硼酸修饰的介孔二氧化硅为填料的硼亲和硅柱的制备：

Step1 介孔二氧化硅的合成：0.28g 十六烷基三甲基溴化铵溶于 240 mL 水中，向其中加入 0.8mL NaOH（2.0 mol/L），升温至 80℃，剧烈搅拌，将 5mL 正硅酸乙酯滴加入溶液中，混合物继续搅拌反应 5 h，产生白色絮状物。离心去除上清液，保留沉淀，用水和甲醇分别洗涤三次，60℃真空干燥，之后将 0.5 g 上述沉淀分散于 150mL 含有 1.5mL 浓盐酸的甲醇溶液中，回流 5 h 之后离心，沉淀 60℃真空干燥，得到介孔二氧化硅。

Step2 介孔二氧化硅的氨基化：称取 0.3 g 介孔二氧化硅，分散于 90 mL 无水甲苯中，加入 2 mL 氨丙基三乙氧基硅烷，氮气保护加热回流 23 h，离心，沉淀用甲苯和甲醇分别洗涤三次后真空干燥，得到氨基化的介孔二氧化硅；

Step3 氨基化介孔二氧化硅的苯硼酸修饰：称取 0.3 g 氨基化介孔二氧化硅分散于 20mL 二甲亚砜中。将 1.0 g 的 4-羧基苯硼酸、0.1g N-羟基琥珀酰亚胺、0.09 g 1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐依次加入 10 mL 二甲亚砜中反应，在室温下搅拌 50 min 后加入到上述氨基化介孔二氧化硅分散液中，室温下搅拌 24 h，离心，沉淀用二甲亚砜、水、甲醇分别洗涤三次，真空干燥，得到苯硼酸修饰的介孔二氧化硅。

Step4 硼亲和柱制备：将 50 mg 苯硼酸修饰的介孔二氧化硅装到聚乙烯固相萃取管中，加上筛板，压实，制得硼亲和柱。

（3）液相色谱-串联质谱分析：配制浓度为 0.1-50 μg/mL 的酪蛋白糖巨肽标准溶液，酪蛋白糖巨肽标准溶液和样品净化液分别经 0.22 微米微孔滤膜过滤；液相色谱分离，色谱条件为：色谱柱：Agilent AdvanceBio PeptideMapping 柱；柱温：35-40℃；进样体积：5-10 微升；流速 0.1-0.3 mL/min；流动相 A 为含有 0.1%甲酸的乙腈水溶液（水:乙腈 v:v = 90:10）；流动相 B 为含有 0.1%甲酸的乙腈溶液，梯度洗脱：0-5 min，98% A；5-55 min，98%-50% A；55-60 min，50%-10% A；60-75 min，10% A。串联质谱仪检测，质谱条件为：电喷雾离子源；正离

子扫描；喷雾电压：5500 V；温度：400-450℃；检测方式：数据依赖型扫描。获得酪蛋白糖巨肽的离子流色谱图和质谱图。以酪蛋白糖巨肽浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作标准曲线。将离子流色谱图的峰面积带入标准曲线分析计算，并结合质谱图进行结构鉴定，从而获得样品中带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的含量和结构信息。

本发明所述的硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法在苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品检测中的应用。

图 1 为本发明的操作流程示意图。图 4 为实施例 2 中富集前后的 MALDI-TOF 质谱图，酪蛋白糖巨肽为 5000-7000 Da 范围内的多肽，可以看出富集前后质荷比 4000 Da 以上的多肽含量明显增多，因此对苯硼酸修饰的介孔二氧化硅对酪蛋白糖巨肽有富集效果。

图 2 为实施例 1 所合成的苯硼酸修饰的介孔二氧化硅的透射电子显微镜图，由图(a)可看出，合成的介孔二氧化硅为直径约 100 nm 的球状材料，分散性良好；由图(b)可看出二氧化硅微球表面有约 2-3 nm 的介孔。

图 3 为实施例 1 所合成的苯硼酸修饰的介孔二氧化硅的扫描电子显微镜和元素谱图图，可以看到 B、C、N、O、Si 的元素分布和材料的分布一致，二氧化硅材料较多处，元素也相应增多，并最终计算出元素 B 的含量为 9.23%。

实施例 2

实施例 2 与实施例 1 的区别在于：本发明的一种硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，包括如下步骤：

（1）样品制备：准确称取已充分均质样品 10 g 于烧杯中，加入 25 mL 去离子水溶解，磁力搅拌、加热至 90℃溶解，冷却至室温后用盐酸调节 pH 至 4.8，定容到 50 mL，转移到离心管中，离心，取 20 mL 上清液为样品液。

（2）硼亲和柱富集净化：硼亲和柱上样品液，上样结束后，用 pH 为 4.5 的盐酸水溶液淋洗，抽干柱内残留液，并弃去以上全部流出液，最后用 5 mL pH 值约为 1.0 的盐酸水溶液洗脱，洗脱液冻干，再用 1 mL 液相色谱流动相（含 0.1%甲酸的乙腈水溶液（水:乙腈 v:v=90:10））重新溶解、定容，得到净化液。

本发明的一种苯硼酸修饰的介孔二氧化硅为填料的硼亲和硅柱的制备：

Step1 介孔二氧化硅的合成：0.25 g 十六烷基三甲基溴化铵溶于 250 mL 水中，向其中加入 1.0 mL NaOH（2.0 mol/L），升温至 80℃，剧烈搅拌，将 7 mL 正硅酸乙酯滴加入溶液中，混合物继续搅拌反应 2 h，产生白色絮状物。离心去除上清液，保留沉淀，用水和甲醇分别洗

涤三次，60℃真空干燥，之后将 0.4g 上述沉淀分散于 160 mL 含有 2.0 mL 浓盐酸的甲醇溶液中，回流 8 h 之后离心，沉淀 60℃真空干燥，得到介孔二氧化硅。

Step2 介孔二氧化硅的氨基化：称取 0.35 g 介孔二氧化硅，分散于 80 mL 无水甲苯中，加入 1.5mL 氨丙基三乙氧基硅烷，氮气保护加热回流 20 h，离心，沉淀用甲苯和甲醇分别洗涤三次后真空干燥，得到氨基化的介孔二氧化硅；

Step3 氨基化介孔二氧化硅的苯硼酸修饰：称取 0.25 g 氨基化介孔二氧化硅分散于 25 mL 二甲亚砜中。将 0.8g 的 4-羧基苯硼酸、0.2 g N-羟基琥珀酰亚胺、0.05 g 1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐依次加入 5 mL 二甲亚砜中反应，在室温下搅拌 30 min 后加入到上述氨基化介孔二氧化硅分散液中，室温下搅拌 20 h，离心，沉淀用二甲亚砜、水、甲醇分别洗涤三次，真空干燥，得到苯硼酸修饰的介孔二氧化硅。

Step4 硼亲和柱制备：将 20 mg 苯硼酸修饰的介孔二氧化硅装到聚乙烯固相萃取管中，加上筛板，压实，制得硼亲和柱。

（3）色谱条件为：色谱柱：Agilent AdvanceBio PeptideMapping 柱；柱温：40℃；进样体积：10 mL；流速 0.3 mL/min；流动相 A 为含有 0.1%甲酸的乙腈水溶液，所述的水和乙腈的体积为 90:10；流动相 B 为含有 0.1%甲酸的乙腈溶液，梯度洗脱：0-5 min，98% A；5-55 min，98%-50% A；55-60 min，50%-10% A；60-75 min，10% A。

质谱条件为：电喷雾离子源；正离子扫描；喷雾电压：5500 V；温度：450℃；检测方式：数据依赖型扫描。标准曲线的制作方法为：配制浓度为 0.1-50 mg/mL 的酪蛋白糖巨肽标准溶液，以酪蛋白糖巨肽浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作标准曲线。

实施例 3

实施例 3 与实施例 1 的区别在于：本发明的一种硼亲和柱富集-液相色谱-串联质谱检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，包括如下步骤：

（1）样品制备：准确称取已充分均质样品 6 g 于烧杯中，加入 20mL 去离子水溶解，磁力搅拌、加热至 95℃溶解，冷却至室温后用盐酸调节 pH 至 4.8，定容到 56 mL，转移到离心管中，离心，取 20 mL 上清液为样品液。

（2）硼亲和柱富集净化：硼亲和柱上样品液，上样结束后，用 pH 为 4.8 的盐酸水溶液淋洗，抽干柱内残留液，并弃去以上全部流出液，最后用 3 mL pH 值约为 1.0 的盐酸水溶液洗脱，洗脱液冻干，再用 1 mL 液相色谱流动相（含 0.1%甲酸的乙腈水溶液（水:乙腈 v:v=90:10））重新溶解、定容，得到净化液。

在步骤（2）中，本发明的一种苯硼酸修饰的介孔二氧化硅为填料的硼亲和硅柱的制备：

Step1 介孔二氧化硅的合成：0.3 g 十六烷基三甲基溴化铵溶于 245 mL 水中，向其中加入 0.9mL NaOH（2.0 mol/L），升温至 80℃，剧烈搅拌，将 6 mL 正硅酸乙酯滴加入溶液中，混合物继续搅拌反应 4 h，产生白色絮状物。离心去除上清液，保留沉淀，用水和甲醇分别洗涤三次，60℃真空干燥，之后将 0.45g 上述沉淀分散于 155 mL 含有 1.55 mL 浓盐酸的甲醇溶液中，回流 7h 之后离心，沉淀 60℃真空干燥，得到介孔二氧化硅。

Step2 介孔二氧化硅的氨基化：称取 0.4 g 介孔二氧化硅，分散于 85mL 无水甲苯中，加入 0.5mL 氨丙基三乙氧基硅烷，氮气保护加热回流 24 h，离心，沉淀用甲苯和甲醇分别洗涤三次后真空干燥，得到氨基化的介孔二氧化硅；

Step3 氨基化介孔二氧化硅的苯硼酸修饰：称取 0.2 g 氨基化介孔二氧化硅分散于 24 mL 二甲亚砜中。将 0.9 g 的 4-羧基苯硼酸、0.15 g N-羟基琥珀酰亚胺、0.08 g 1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐依次加入 8 mL 二甲亚砜中反应，在室温下搅拌 60 min 后加入到上述氨基化介孔二氧化硅分散液中，室温下搅拌 10 h，离心，沉淀用二甲亚砜、水、甲醇分别洗涤三次，真空干燥，得到苯硼酸修饰的介孔二氧化硅。

Step4 硼亲和柱制备：将 40 mg 苯硼酸修饰的介孔二氧化硅装到聚乙烯固相萃取管中，加上筛板，压实，制得硼亲和柱。

以上所述，仅为本发明较佳的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1.一种检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，其特征在于包括如下步骤：以苯硼酸修饰介孔二氧化硅为硼亲和柱填料，利用苯硼酸对酪蛋白糖巨肽中丝氨酸和苏氨酸残基上特殊糖基—唾液酸的亲和特性，通过改变 pH 调控带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的吸附和洗脱，再以液相色谱-串联质谱分析，实现对苯丙酮尿症特殊医学用途配方食品中酪蛋白糖巨肽的检测；步骤如下：（1）样品制备：准确称取已充分均质样品 5-10 g 于烧杯中，加入 20-30 mL 去离子水溶解，磁力搅拌、加热至 90℃溶解，冷却至室温后用盐酸调节 pH 至 4.5-5.0，定容到 50 mL，转移到离心管中，离心，取 20 mL 上清液为样品液；

（2）硼亲和柱富集净化； Step1 介孔二氧化硅的合成： 0.25-0.3 g 十六烷基三甲基溴化铵溶于 240-250 mL 水中，向其中加入 2.0 mol/L 的 0.8-1.0 mL NaOH，升温至 80℃，剧烈搅拌，将 5-7 mL 正硅酸乙酯滴加入溶液中，混合物继续搅拌反应 2-5 h，产生白色絮状物；离心弃去上清液，保留沉淀，用水和甲醇分别洗涤三次，60℃真空干燥，之后将 0.4-0.5 g 上述沉淀分散于 150-160 mL 含有 1.5-2.0 mL 浓盐酸的甲醇溶液中，回流 5-8 h 之后离心，沉淀 60℃真空干燥，得到介孔二氧化硅；

Step2 介孔二氧化硅的氨基化：称取 0.3-0.4 g 介孔二氧化硅，分散于 80-90 mL 无水甲苯中，加入 0.5-2 mL 氨丙基三乙氧基硅烷，氮气保护加热回流 20-24 h，离心，沉淀用甲苯和甲醇分别洗涤三次后真空干燥，得到氨基化的介孔二氧化硅；

Step3 氨基化介孔二氧化硅的苯硼酸修饰：称取 0.2-0.3 g 氨基化介孔二氧化硅分散于 20-25 mL 二甲亚砜中，将 0.8-1.0 g 的 4-羧基苯硼酸、0.1-0.2 g N-羟基琥珀酰亚胺、0.05-0.1 g 1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐依次加入 5-10 mL 二甲亚砜中反应，在室温下搅拌 30-60 min 后加入到上述氨基化介孔二氧化硅分散液中，室温下搅拌 10-24 h，离心，沉淀用二甲亚砜、水、甲醇分别洗涤三次，真空干燥，得到苯硼酸修饰的介孔二氧化硅；

Step4 硼亲和柱上样品液，上样结束后，用 pH 为 4.5-5.0 的盐酸水溶液淋洗，抽干柱内残留液，并弃去以上全部流出液，最后用 2 mL pH 值为 1.0 的盐酸水溶液洗脱，洗脱液冻干，再用 1 mL 液相色谱流动相重新溶解、定容，得到净化液，以上淋洗和洗脱液的 pH 值仅适用于唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的淋洗和洗脱，不适用于其他糖基化修饰的酪蛋白糖巨肽；

硼亲和柱制备：将 20 mg 苯硼酸修饰的介孔二氧化硅装到聚乙烯固相萃取管中，加上筛板，压实，制得硼亲和柱；

（3）液相色谱-串联质谱分析：净化液经滤膜过滤后供液相色谱-串联质谱仪检测，获得

酪蛋白糖巨肽的离子流色谱图和质谱图，将离子流色谱图的峰面积带入标准曲线分析计算，并结合质谱图进行结构鉴定，从而获得样品中带有唾液酸糖基的酪蛋白糖巨肽的含量和结构信息。

2.根据权利要求 1 所述的检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，其特征在于：在步骤（3）中，用于重新溶解多肽的流动相配比为：含 0.1%甲酸的乙腈水溶液所述的水和乙腈的体积比为 90:10。

3.根据权利要求 1 所述的检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，其特征在于：在步骤（3）中，色谱条件为：色谱柱：Agilent AdvanceBio PeptideMapping 柱；柱温：40℃；进样体积：10 μL；流速 0.3 mL/min；流动相 A 为含有 0.1%甲酸的乙腈水溶液，所述的水和乙腈的体积为 90:10；流动相 B 为含有 0.1%甲酸的乙腈溶液，梯度洗脱：0-5 min，98% A；5-55 min，98%-50% A；55-60 min，50%-10% A；60-75 min，10% A。

4.根据权利要求 1 所述的检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，其特征在于：在步骤（3）中，质谱条件为：电喷雾离子源；正离子扫描；喷雾电压：5500 V；温度：450℃；检测方式：数据依赖型扫描。

5.根据权利要求 1 所述的检测唾液酸糖基酪蛋白糖巨肽的方法，其特征在于：在步骤（3）中，标准曲线的制作方法为：配制浓度为 0.1-50 μg/mL 的酪蛋白糖巨肽标准溶液，以酪蛋白糖巨肽浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作标准曲线。

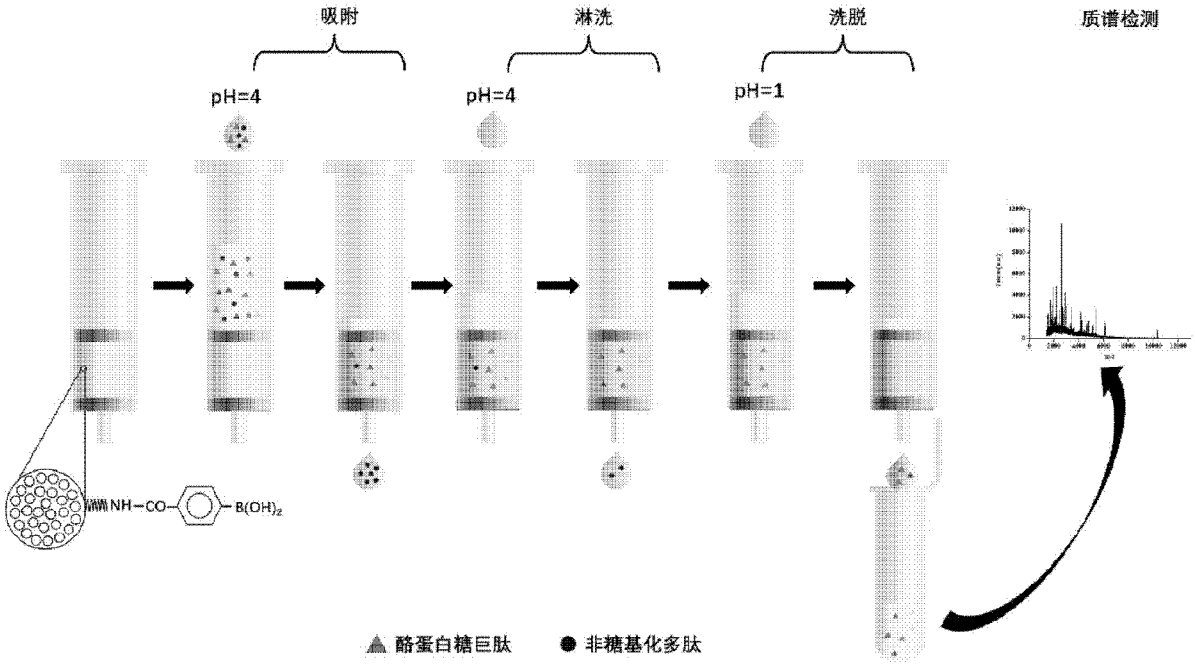


图 1

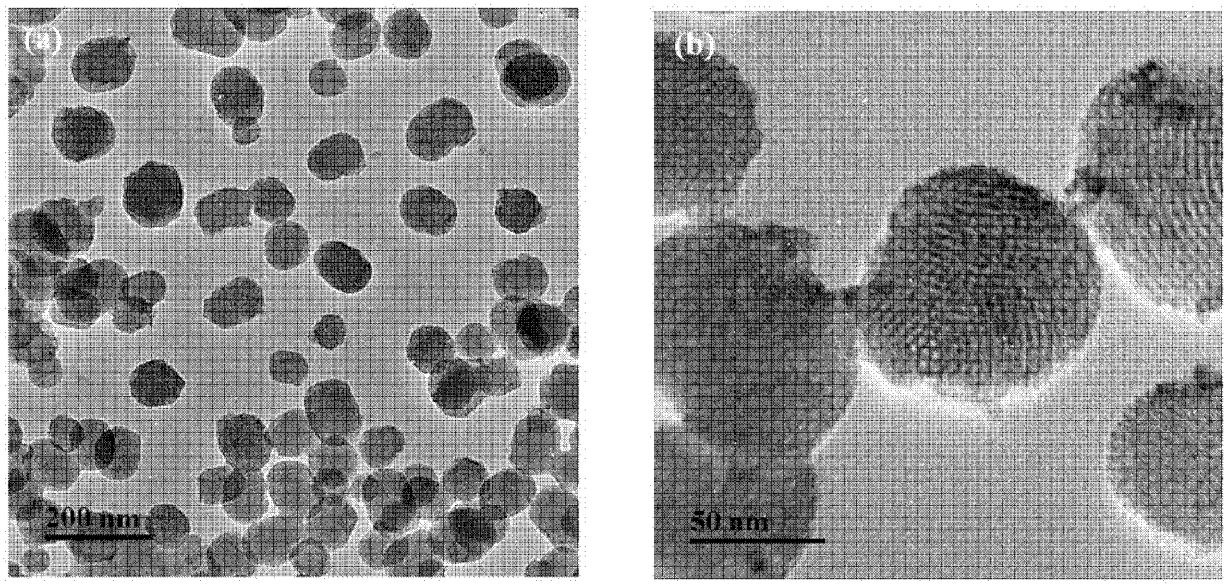


图 2

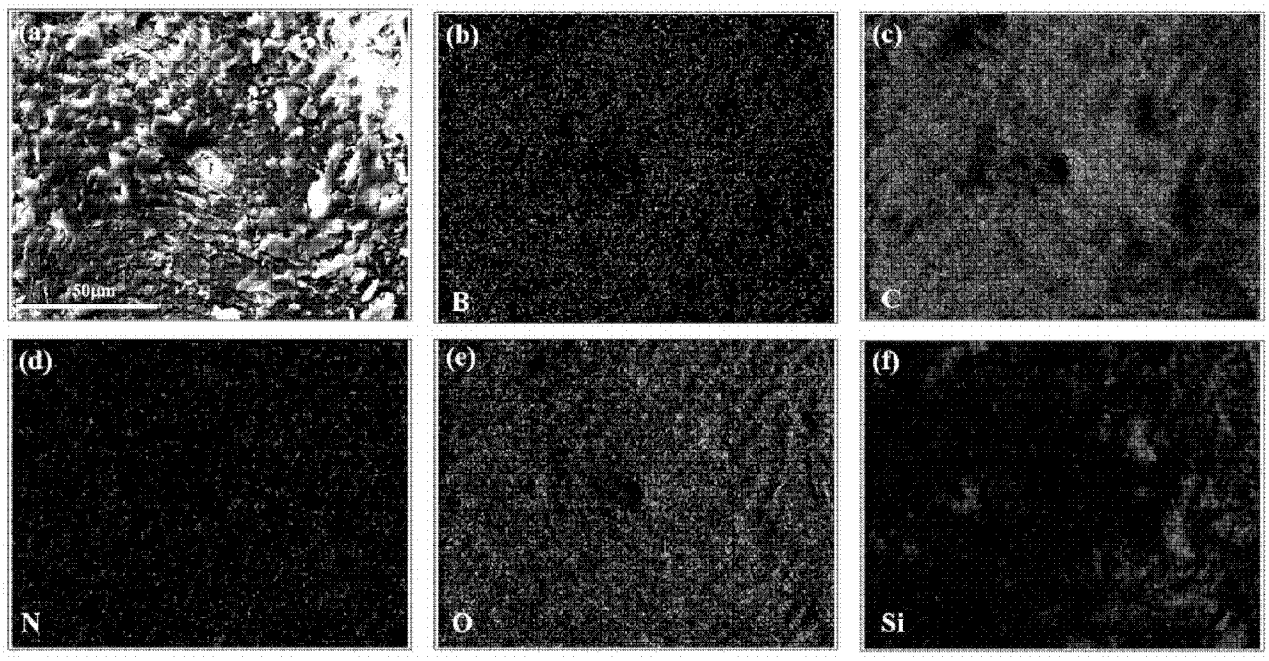


图 3

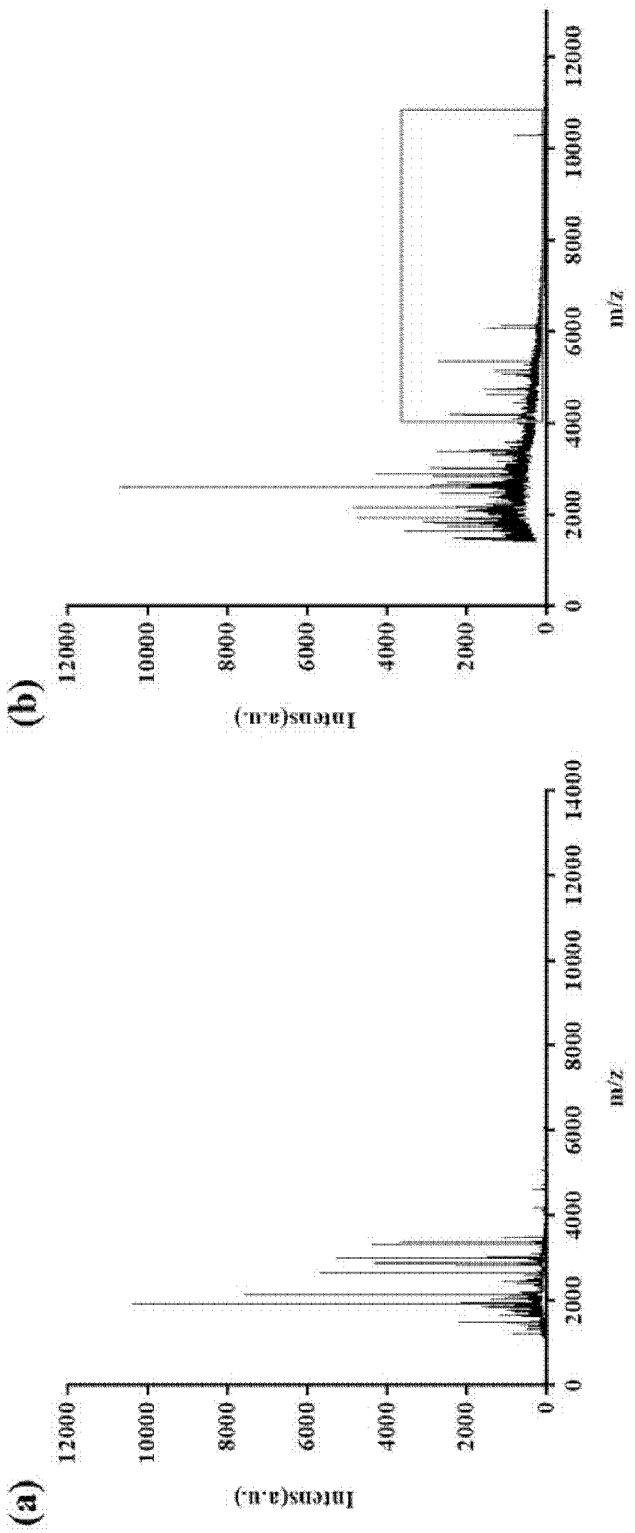


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/119544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/02(2006.01)i; G01N 30/08(2006.01)i; G01N 30/72(2006.01)i; B01J 20/283(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N, B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPABS, CNTXT; ENTXT, VEN, CNKI, 万方 WANFANG, 读秀 DUXIU, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science, ACS, Pubmed, RSC: 酪蛋白, 干酪素, 酪朊, 乳酪素, 糖巨肽, 糖肽, 糖蛋白, 硼, 苯硼酸, 富集, 收集, 聚集, 濃縮, 濃化, 浓缩, 增加, 提高, 液相, 质谱, casein, glycomacropeptide, CGMP, glyc+, +peptide?, +protein, +boron+, enrich+, LC, MS, liquid chromatography, mass spectrometry

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114264746 A (JIANGNAN UNIVERSITY et al.) 01 April 2022 (2022-04-01) description, paragraphs 7-62	1-5
A	CN 113304708 A (TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY) 27 August 2021 (2021-08-27) entire document	1-5
A	CN 109824762 A (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 31 May 2019 (2019-05-31) entire document	1-5
A	CN 104535381 A (PEKING UNIVERSITY) 22 April 2015 (2015-04-22) entire document	1-5
A	CN 113687063 A (NANCHANG UNIVERSITY) 23 November 2021 (2021-11-23) entire document	1-5
A	CN 103149312 A (NORTHEAST AGRICULTURAL UNIVERSITY) 12 June 2013 (2013-06-12) entire document	1-5

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 October 2022	**01 November 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104374848 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 25 February 2015 (2015-02-25) entire document	1-5
A	CN 107607640 A (FUDAN UNIVERSITY) 19 January 2018 (2018-01-19) entire document	1-5
A	CN 113144205 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 23 July 2021 (2021-07-23) entire document	1-5
A	CN 105030655 A (JINAN UNIVERSITY) 11 November 2015 (2015-11-11) entire document	1-5
A	CN 107505384 A (FUDAN UNIVERSITY) 22 December 2017 (2017-12-22) entire document	1-5
A	CN 104383548 A (FUZHOU UNIVERSITY) 04 March 2015 (2015-03-04) entire document	1-5
A	RU 2093525 C1 (INSTITUT ORGANICHESKOJ KHIMII UFIMSKOGO NAUCHNOGO TSENTRA RAN) 20 October 1997 (1997-10-20) entire document	1-5
A	US 2009029343 A1 (LARSEN, M. R.) 29 January 2009 (2009-01-29) entire document	1-5
A	WO 2019144643 A1 (NEW HOPE SHUANGXI DAIRY SUZHOU CO., LTD.) 01 August 2019 (2019-08-01) entire document	1-5
A	GB 2589278 A (ANPLE LABORATORY TECHNOLOGIES (SHANGHAI) INC.) 26 May 2021 (2021-05-26) entire document	1-5
A	张丽媛等 (ZHANG, Liyuan et al.). "基于叠氮基-氰基点击化学的苯硼酸亲和硅胶的制备及其在糖蛋白/糖肽选择性富集中的应用 (Preparation of Novel Phenyl Boronic Acid Functionalized Silica Gel Using Triazo-cyanide Click Chemistry and Its Application in Glycoprotein/Glycopeptide Selective Enrichment)" *色谱 (Chinese Journal of Chromatography),* Vol. 37, No. 3, 08 March 2019 (2019-03-08), pages 279-286	1-5
A	杨帆等 (YANG, Fan et al.). "基于巯基-烯点击反应制备有机-无机杂化硼酸亲和整体柱用于糖蛋白的选择性富集 (Preparation of Organic-inorganic Hybrid Boronate Affinity Monolith Via Thiol-ene Click Reaction for Specific Capture of Glycoproteins)" *色谱 (Chinese Journal of Chromatography),* Vol. 31, No. 6, 28 June 2013 (2013-06-28), pp. 531-536	1-5
A	李恒业 (LI, Hengye). "高性能苯硼酸配基的设计、合成及硼亲和整体柱的制备与应用 (The Design, Synthesis of High-performance Boronate Ligands as well as the Preparation and Application of Boronate Affinity Monlithic Columns)" *中国博士学位论文全文数据库 工程科技I辑 (Science-Engineering (A), China Doctoral Dissertations Full-text Database),* No. 4, 15 April 2013 (2013-04-15), pp. 1-34	1-5
A	路越 (LU, Yue). "整体柱硼亲和色谱—生物质谱联用方法对糖蛋白的富集及检测 (Isolation and Detection of Glycoproteins by Combining Monolithic Boronate Affinity Chromatography and Biological Mass Spectrometry)" *中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑 (Chinese Master's Theses Full-Text Database, Engineering Science and Technology I),* No. 12, 15 December 2014 (2014-12-15), pp. 39-48	1-5

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	张汉卿等 (ZHANG, Hn). "4-巯基苯硼酸修饰二维二硫化钼纳米复合材料的制备及其用于N-糖肽特异性富集 (Preparation of 4-mercaptophenylboronic Acid Functionalized Two-dimensional Molybdenum Disulfide Nanocomposite and Its Specific Enrichment for N-glycopeptide)" *色谱 (Chinese Journal of Chromatography),* Vol. 38, No. 8, 08 August 2020 (2020-08-08), pp. 891-899	1-5
A	CHEN, Chenchun et al. "Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment" *Analyst,* Vol. 139, No. 4, 21 February 2014 (2014-02-21), pp. 688-704	1-5
A	HUANG Baoyu et al. "Stationary phases for the enrichment of glycoproteins and glycopeptides" *Electrophoresis,* Vol. 35, No. 15, 01 August 2014 (2014-08-01), pp. 2091-2107	1-5
A	LU, Yue et al. "Fine-tuning the specificity of boronate affinity monoliths toward glycoproteins through pH manipulation" *Analyst,* Vol. 138, No. 1, 07 January 2013 (2013-01-07), pp. 290-298	1-5
A	XIE, Yiqin et al. "Core-shell structured magnetic metal-organic framework composites for highly selective detection of N-glycopeptides based on boronic acid affinity chromatography" *Journal of Chromatography A,* Vol. 1540, 09 March 2018 (2018-03-09), pp. 87-93	1-5
A	KONG, Siyuan et al. "Effective Enrichment Strategy Using Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Graphene–Silica Composites for Intact N- and O-Linked Glycopeptide Analysis in Human Serum" *Analytical Chemistry,* Vol. 93, No. 17, 20 April 2021 (2021-04-20), pp. 6682-6691	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/119544

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114264746	A	01 April 2022	None			
CN	113304708	A	27 August 2021	None			
CN	109824762	A	31 May 2019	None			
CN	104535381	A	22 April 2015	None			
CN	113687063	A	23 November 2021	None			
CN	103149312	A	12 June 2013	None			
CN	104374848	A	25 February 2015	None			
CN	107607640	A	19 January 2018	None			
CN	113144205	A	23 July 2021	None			
CN	105030655	A	11 November 2015	None			
CN	107505384	A	22 December 2017	None			
CN	104383548	A	04 March 2015	None			
RU	2093525	C1	20 October 1997	None			
US	2009029343	A1	29 January 2009	EP	2013224	A2	14 January 2009
				WO	2007124750	A2	08 November 2007
WO	2019144643	A1	01 August 2019	CN	108414628	A	17 August 2018
GB	2589278	A	26 May 2021	GB	202102631	D0	07 April 2021
				CA	3109058	A1	30 April 2021
				JP	2022503681	A	12 January 2022

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/119544

A. 主题的分类

G01N 30/02(2006.01)i; G01N 30/08(2006.01)i; G01N 30/72(2006.01)i; B01J 20/283(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N, B01J

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

WPABS, CNTXT; ENTXT, VEN, CNKI, 万方, 读秀, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science, ACS, Pubmed, RSC: 酪蛋白, 干酪素, 酪朊, 乳酪素, 糖巨肽, 糖肽, 糖蛋白, 硼, 苯硼酸, 富集, 收集, 聚集, 濃縮, 濃化, 浓缩, 增加, 提高, 液相, 质谱, casein, glycomacropeptide, CGMP, glyc+, +peptide?, +protein, +boron+, enrich+, LC, MS, liquid chromatography, mass spectrometry

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 114264746 A (江南大学等) 2022年4月1日 (2022-04-01) 说明书第7-62段	1-5
A	CN 113304708 A (天津医科大学) 2021年8月27日 (2021-08-27) 全文	1-5
A	CN 109824762 A (西北大学) 2019年5月31日 (2019-05-31) 全文	1-5
A	CN 104535381 A (北京大学) 2015年4月22日 (2015-04-22) 全文	1-5
A	CN 113687063 A (南昌大学) 2021年11月23日 (2021-11-23) 全文	1-5
A	CN 103149312 A (东北农业大学) 2013年6月12日 (2013-06-12) 全文	1-5
A	CN 104374848 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2015年2月25日 (2015-02-25) 全文	1-5

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。　　☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年10月23日	2022年11月1日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 何莉莉 电话号码 (86-10)62085644

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107607640 A (复旦大学) 2018年1月19日 (2018 - 01 - 19) 全文	1-5
A	CN 113144205 A (浙江大学) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 全文	1-5
A	CN 105030655 A (暨南大学) 2015年11月11日 (2015 - 11 - 11) 全文	1-5
A	CN 107505384 A (复旦大学) 2017年12月22日 (2017 - 12 - 22) 全文	1-5
A	CN 104383548 A (福州大学) 2015年3月4日 (2015 - 03 - 04) 全文	1-5
A	RU 2093525 C1 (INST ORCH KHIM UFIM NAUCHNOGO) 1997年10月20日 (1997 - 10 - 20) 全文	1-5
A	US 2009029343 A1 (LARSEN MARTIN ROSSEL) 2009年1月29日 (2009 - 01 - 29) 全文	1-5
A	WO 2019144643 A1 (NEW HOPE SHUANGXI DAIRY SUZHOU CO LTD) 2019年8月1日 (2019 - 08 - 01) 全文	1-5
A	GB 2589278 A (ANPLE LABORATORY TECH SHANGHAI INC) 2021年5月26日 (2021 - 05 - 26) 全文	1-5
A	张丽媛等. "基于叠氮基-氰基点击化学的苯硼酸亲和硅胶的制备及其在糖蛋白/糖肽选择性富集中的应用" 色谱, 第37卷, 第3期, 2019年3月8日 (2019 - 03 - 08), 第279-286页	1-5
A	杨帆等. "基于巯基-烯点击反应制备有机-无机杂化硼酸亲和整体柱用于糖蛋白的选择性富集" 色谱, 第31卷, 第6期, 2013年6月28日 (2013 - 06 - 28), 第531-536页	1-5
A	李恒业. "高性能苯硼酸配基的设计、合成及硼亲和整体柱的制备与应用" 中国博士学位论文全文数据库 工程科技Ⅰ辑, 第4期, 2013年4月15日 (2013 - 04 - 15), 第1-34页	1-5
A	路越. "整体柱硼亲和色谱—生物质谱联用方法对糖蛋白的富集及检测" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技Ⅰ辑, 第12期, 2014年12月15日 (2014 - 12 - 15), 第39-48页	1-5
A	张汉卿等. "4-巯基苯硼酸修饰二维二硫化钼纳米复合材料的制备及其用于N-糖肽特异性富集" 色谱, 第38卷, 第8期, 2020年8月8日 (2020 - 08 - 08), 第891-899页	1-5
A	Chen-Chun Chen等. "Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment" Analyst, 第139卷, 第4期, 2014年2月21日 (2014 - 02 - 21), 第688-704页	1-5
A	Huang BY等. "Stationary phases for the enrichment of glycoproteins and glycopeptides" Electrophoresis, 第35卷, 第15期, 2014年8月1日 (2014 - 08 - 01), 第2091-2107页	1-5

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Yue Lu等. "Fine-tuning the specificity of boronate affinity monoliths toward glycoproteins through pH manipulation" Analyst, 第138卷, 第1期, 2013年1月7日 (2013-01-07), 第290-298页	1-5
A	Yiqin Xie等. "Core-shell structured magnetic metal-organic framework composites for highly selective detection of N-glycopeptides based on boronic acid affinity chromatography" Journal of Chromatography A, 第1540卷, 2018年3月9日 (2018-03-09), 第87-93页	1-5
A	Siyuan Kong等. "Effective Enrichment Strategy Using Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Graphene-Silica Composites for Intact N- and O-Linked Glycopeptide Analysis in Human Serum" Analytical Chemistry, 第93卷, 第17期, 2021年4月20日 (2021-04-20), 第6682-6691页	1-5

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/119544

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114264746	A	2022年4月1日	无			
CN	113304708	A	2021年8月27日	无			
CN	109824762	A	2019年5月31日	无			
CN	104535381	A	2015年4月22日	无			
CN	113687063	A	2021年11月23日	无			
CN	103149312	A	2013年6月12日	无			
CN	104374848	A	2015年2月25日	无			
CN	107607640	A	2018年1月19日	无			
CN	113144205	A	2021年7月23日	无			
CN	105030655	A	2015年11月11日	无			
CN	107505384	A	2017年12月22日	无			
CN	104383548	A	2015年3月4日	无			
RU	2093525	C1	1997年10月20日	无			
US	2009029343	A1	2009年1月29日	EP	2013224	A2	2009年1月14日
				WO	2007124750	A2	2007年11月8日
WO	2019144643	A1	2019年8月1日	CN	108414628	A	2018年8月17日
GB	2589278	A	2021年5月26日	GB	202102631	D0	2021年4月7日
				CA	3109058	A1	2021年4月30日
				JP	2022503681	A	2022年1月12日